

Jerzy CHMIEŁOWSKI*, Mieczysław PYTLAK*, Andrzej WOŹNICA*

AKUMULACJA URANU PRZEZ BAKTERIE O WZMOŻONEJ AKTYWNOŚCI FOSFATAZOWEJ

W pracach Macaskie i Deana wykorzystano szczep *Citrobacter* sp. o zwiększonej aktywności fosfatazowej i zdolności enzymatycznego rozkładu estrów fosforowych na przykład glicerolo-2-fosforanu, do akumulacji uranu. Uwolniony fosforan powoduje wytrącanie i akumulację metali ciężkich na powierzchni komórek w postaci nierozpuszczalnych, zwartych precipitatów. Celem pracy była krytyczna ocena tego mechanizmu akumulacyjnego u wybranych bakterii. Stosowano szczepy *Citrobacter freundii* oraz szczepy bakterii izolowanych z gleby obciążonej przez metale ciężkie. Wykazywały one wzmożoną aktywność fosfatazy kwaśnej z optimum działania przy pH 5, typowej dla drobnoustrojów. Badano dynamikę akumulacji uranu (w postaci azotanu uranylu) w stężeniu 0,1 mM przez te bakterie w obecności wzrastających stężeń (od 1 do 16 mM) glicerolo-2-fosforanu jako substratu fosfatazy oraz w układzie bezsubstratowym. Stwierdzono, że w obecności niskich stężeń (1,0 mM) glicerolo-2-fosforanu występował około 30 procentowy wzrost akumulacji uranu w porównaniu z układem bezsubstratowym. Wyższe stężenia tego estru powodowały natomiast obniżenie akumulacji. Mikroskopia elektronowa ultracienkich skrawków komórek wykazywała głównie powierzchniowe wiązanie uranu w postaci zwartej warstwy osadów. Wykazane hamowanie akumulacji uranu mogło być związane z tworzeniem w roztworach o pH 5 do 6 rozpuszczalnych związków uranylu z glicerolo-2-fosforanem, z wykorzystaniem grup fosforanowych. Potwierdzenie tego przypuszczenia uzyskano przez stwierdzenie 60 do 80% wymywania uranu związanego w biomacie bakterii przez 10 mM roztwór glicerolo-2-fosforanu. Wyniki obserwacji nie potwierdziły przypuszczeń wynikających z założeń Macaskie i Deana, dotyczących możliwości wykorzystania powszechnie występujących bakterii o wzmożonej aktywności fosfatazowej do akumulacji uranu. Być może rozbieżność ta wynika ze szczególnych cech stosowanego przez nich szczepu *Citrobacter* sp., który wykazywał aktywność nietypowej, powierzchniowo zlokalizowanej fosfatazy w szerokim zakresie pH 6 do 9.

1. WSTĘP

W wielu ośrodkach naukowych prowadzi się badania nad opracowaniem metod akumulacji uranu ze środowisk o dużym rozproszeniu tego pierwiastka oraz nad dekontaminacją wód odpadowych obciążonych przez ten nuklid (Chmielowski i in. 1993).

*Katedra Biochemii i Pracownia Izotopowa, Uniwersytet Śląski, ul. Jagiellońska 28, 40-032 Katowice.

Interesujące obserwacje opisali Macaskie i Dean (1984a,b, 1987a,b). Wykazali oni zdolność akumulacji uranu przez szczepy bakterii rodzaju *Citrobacter* o zwiększonej aktywności fosfatazowej w obecności fosforanów organicznych, w szczególności glicerolo-2-fosforanu. Zjawisko to polega na enzymatycznej hydrolizie wiązań estrowych fosforanów organicznych przez fosfatazę z jednoczesnym odłożeniem na powierzchni komórki bakterii nierozpuszczalnych, zwartych precipitatów fosforanów metali ciężkich. Mechanizm taki mógłby stwarzać możliwość opracowania biotechnologicznych metod dekontaminacji i odzysku uranu z roztworów.

Celem niniejszej pracy była krytyczna ocena tego mechanizmu akumulacyjnego u wybranych szczepów bakterii, które wykazywały wzmożoną aktywność fosfatazy kwaśnej z optimum działania przy pH 5, typowej dla drobnoustrojów.

2. MATERIAŁY I METODYKA

W badaniach stosowano szczepy *Citrobacter freundii* oznaczone symbolami PCM 1569 i PCM 2347, pochodzące z kolekcji mikroorganizmów Instytutu Immunologii i Terapii Doświadczalnej PAN we Wrocławiu. Izolowano również szczepy bakterii zasiedlające hałdy odpadów po przeróbce rud cynku i ołowiu. Spośród 30 szczepów dwa wykazywały wzmożoną aktywność fosfatazową. Oznaczono je roboczo jako szczep A oraz B. Hodowlę bakterii prowadzono w kolbach płaskodennych napowietrzanych przez wytrząsanie w temp. 30 °C. Skład pożywek hodowlanych przedstawiono w tab. 1. Biomase bakterii użytych do badań określano metodą wagową z użyciem ultrafiltrów membranowych. Niewielka zawartość związków nieorganicznych pozwalała na przyjęcie suchej masy (s.m.) za wartość biomasy bakterii. Biomase tę oddzielano od zawiesiny przez 10-minutowe wirowanie przy 4000 g.

Aktywność fosfatazową szczepów bakterii oznaczano metodą Bodansky'ego (Mejbaum-Katzenellenbogen, Mochnacka 1969). Pod wpływem fosfatazy produkowanej przez komórki bakterii 16 mM glicerolo-2-fosforan ulegał rozkładowi z wydzieleniem wolnego fosforanu. Wolne fosforany oznaczano spektrofotometrycznie metodą Fiske-Subarowa (Mejbaum-Katzenellenbogen, Mochnacka 1969). Badania akumulacji uranu prowadzono w kolbach płaskodennych napowietrzanych przez wytrząsanie w temperaturze 30 °C, do których wprowadzano 0,4 g/l biomasy bakterii. Do przygotowanych zawiesin wprowadzano uranyl tak, by ostateczne stężenie w kolbie wynosiło 0,1 mM. Odczyn środowiska korygowano do pH 6. W przypadku układów substratowych dodawano glicerolo-2-fosforan o różnym stężeniu.

Do oznaczania uranu w biomase bakterii stosowano metodę radiometryczną opracowaną przez Chwistka i innych (1988), opartą na pomiarze scyntylacji pochodzących od cząstek α emitowanych przez uran naturalny. Próbkę badano z

Tabela 1. Skład pożywek do hodowli bakterii

Rodzaj pożywki	Skład pożywki
Pożywka do hodowli szczepów <i>Citrobacter freundii</i>	3 g hydrolizatu kazeiny 3g ekstraktu drożdżowego 17 g KH_2PO_4 12,8 g K_2HPO_4 0,245 g $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 10 ml 50% glukozy 1000 ml wody destylowanej
Pożywka do hodowli bakterii glebowych	20 g glukozy 3g ekstraktu drożdżowego 5,6 g KH_2PO_4 12,8 g K_2HPO_4 0,2 g $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0,2 g NaCl 0,3 g $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 1000 ml wody destylowanej
Pożywka do hodowli szczepów <i>Citrobacter freundii</i> w obecności glicerolo-2-fosforanu	7,1 g glicerolo-2-fosforanu 13,5 ml gliceryny 0,5 g $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 0,2 g NaCl ilości śladowe MnSO_4 i FeSO_4

zastosowaniem scyntylatora żelującego Unisolve 1. Pomiary radiometryczne prowadzono z użyciem licznika scyntylacyjnego Beckman LS 5000 TD. Dla określenia ilości uranu w próbce stosowano metodę wzorca wewnętrznego, polegającą na dodaniu do próbek znanej ilości uranu.

Uran akumulowany w biomase bakterii wymywano roztworem 10 mM glicerolo-2-fosforanu. W tym celu do pięciu próbek z odwirowaną biomasą o tej samej zawartości uranu wprowadzano po 20 ml glicerolo-2-fosforanu. Po 1-minutowym wytrząsaniu, zawiesinę wirowano i w osadzie oznaczano zawartość uranu. Otrzymany osad biomasy poddawano kolejnym próbom wymywania uranu. Czynność tę powtarzano pięciokrotnie.

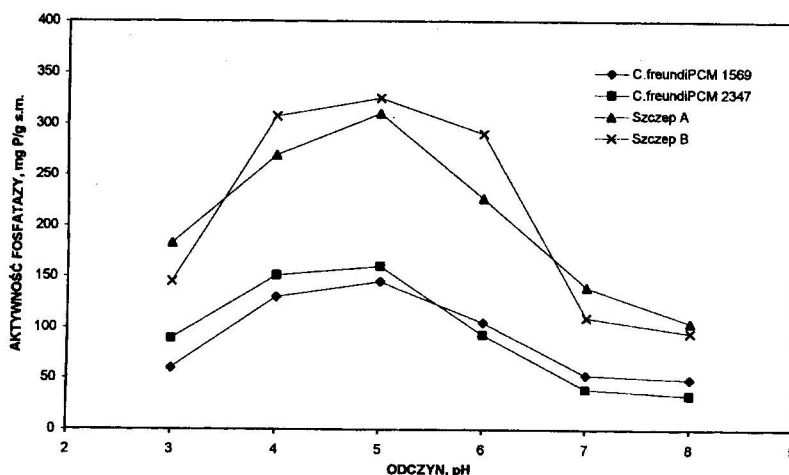
Uran akumulowany w strukturach komórkowych bakterii lokalizowano z użyciem transmisyjnej mikroskopii elektronowej. Zastosowano metodę histologiczną Glauerta (1974) z modyfikacją dotyczącą utrwalania komórek bakterii. Utrwalano je 2,5% aldehydem glutarowym w buforze kakodylowym przez 48 godzin w temperaturze pokojowej. Aby zapobiec odmyciu uranu akumulowanego na powierzchni komórek, stosowano zatapianie w agarze. Preparaty odwadniano etanolem. Do utwardzania próbek stosowano mieszaninę żywic eponowych. Preparaty

cięto z użyciem ultramikrotomu Reichart OUM-3, a uzyskane ultracienkie skrawki obserwowano w mikroskopie elektronowym JEOL-JEN100S.

3. WYNIKI I ICH OMÓWIENIE

Macaskie i Dean (1984a,b, 1987a,b) oraz współpracownicy (Pickett i Dean 1977; Aickin i in. 1979; Michel i in. 1986) z Uniwersytetu w Oxfordzie prowadzili od wielu lat badania nad akumulacją metali ciężkich: ołowiu, kadmu, miedzi i uranu przez bakterie rodzaju *Citrobacter* o zwiększonej aktywności fosfatazowej. W pracach tych stwierdzono, że ilość nagromadzonego metalu w biomase bakterii jest uzależniona od aktywności fosfatazowej i obecności fosforanu organicznego w środowisku inkubacyjnym (Macaskie i in. 1987). Fosfataza odszczepia z glicerolo-2-fosforanu fosforan, który strąca jony metali ciężkich na powierzchni komórek w postaci nierozpuszczalnych fosforanów.

Model fosfatazowy opracowany przez Macaskie i Deana dla wybranego przez nich szczepu *Citrobacter* sp. stanowił inspirację do zbadania możliwości zwiększenia akumulacji uranu przez inne gatunki rodzaju *Citrobacter* oraz izolowane z gleby bakterie fosfatazododatnie. Pracę nad tym zagadnieniem rozpoczęto od wybrania kilku szczepów bakterii wykazujących zwiększoną aktywność fosfatazową. Istotne było określenie optymalnych warunków hodowli tych bakterii, w których ujawniałaby się maksymalna aktywność fosfatazy. Stwierdzono, że aktywność fosfatazy dwóch badanych szczepów *Citrobacter freundii* oraz izolowanych szczepów A i B bakterii glebowych była największa w przedziale pH 4 do 6 z maksimum występującym przy pH 5 (rys. 1). Była to więc fosfataza kwaśna (E.C.

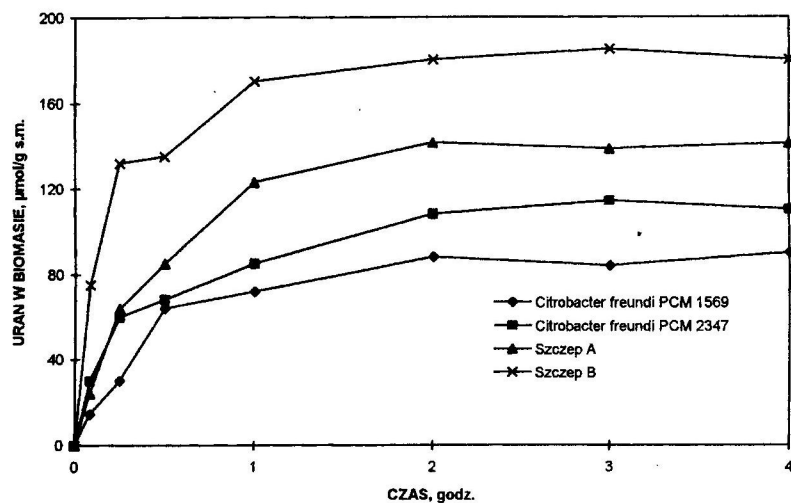


Rys. 1. Aktywność fosfatazowa wybranych szczepów *Citrobacter freundii* i szczepów bakterii glebowych w zależności od pH

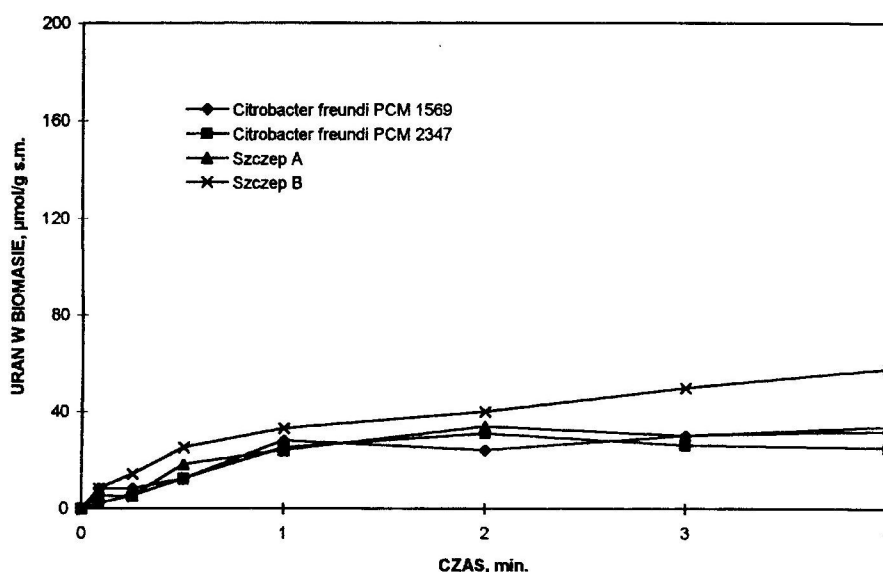
3.1.3.20) typowa dla wielu mikroorganizmów. Wzmoczoną aktywnością fosfatazy odznaczały się szczepy A i B bakterii glebowych (które uwalniały z fosforanów organicznych odpowiednio 295 i 312 mg fosforanu/g s.m.) oraz szczepy *Citrobacter freundii* PCM 1569 i PCM 2347 (odpowiednio 126 i 130 mg fosforanu/g s.m.).

W literaturze są informacje o występowaniu licznych mikroorganizmów wykazujących aktywność alkalicznej i kwaśnej fosfatazy. Pickett i Dean (1977), prowadząc badania nad *Bacillus subtilis* ssp. *niger* ATCC 9372, stwierdzili dwa szczyty aktywności fosfatazowej. Jeden przy pH 4,6, zaś drugi przy pH 4,8. Macaskie i Dean (1984a,b, 1987a,b) oraz Hambling i in. (1987) dysponowali w pracach szczepem *Citrobacter* sp. z nietypową fosfatazą wykazującą znaczną aktywność w szerokim w zakresie pH: od 5 do 9. Poziom aktywności fosfatazowej badanych szczepów *Citrobacter freundii* oraz izolatów A i B był niższy od podawanych przez Macaskie i Deana, których szczep *Citrobacter* sp. wykazywał szczególnie wysoką aktywność fosfatazy.

Wyselekcjonowane szczepy bakterii poddano próbie akumulacji uranu. Obserwacje prowadzono w układzie bezsubstratowym oraz w obecności 10 mM glicero-2-fosforanu (substratu fosfatazy) przy pH 6, z użyciem 0,4 g s.m./l biomasy bakterii oraz stężeniu wyjściowym uranu 0,1 mM, w czasie 3 godzin aeracji w temperaturze 30 °C. Poziom nagromadzenia uranu w układach bezsubstratowych przez szczepy *Citrobacter freundii* PCM 1569 i PCM 2347 wynosił odpowiednio 0,090 i 0,110 mmol/g s.m. i był niższy od stopnia akumulacji tego nuklidu przez szczepy bakterii glebowych A oraz B (odpowiednio 0,141 i 0,185 mmol/g s.m.) (rys. 2).



Rys. 2. Przebieg akumulacji uranu przez szczepy bakterii o wzmoczonej aktywności fosfatazowej w układzie bezsubstratowym. Biomasa bakterii 0,4 g/l. Stężenie początkowe uranylu 0,1 mM, pH 6

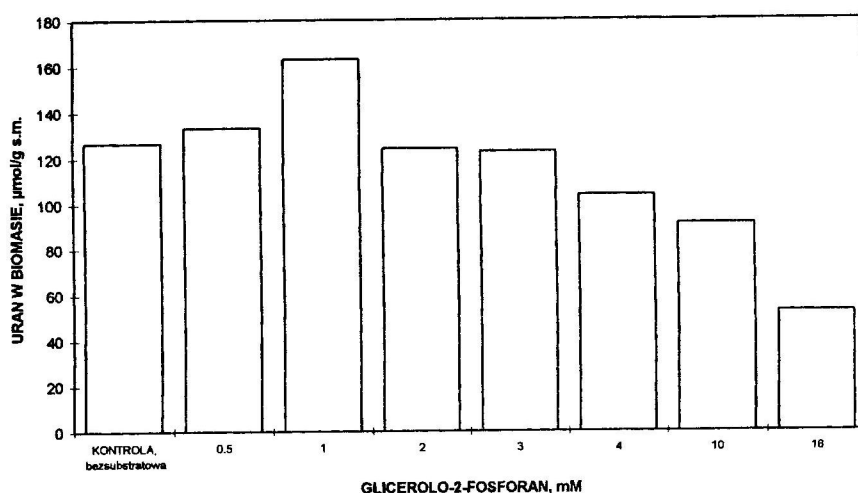


Rys. 3. Przebieg akumulacji uranu przez szczepy bakterii o wzmożonej aktywności fosfatazowej w obecności 10 mM glicerolo-2-fosforanu. Biomasa bakterii 0,4 g/l. Stężenie początkowe uranylu 0,1 mM, pH 6

Obecność 10 mM glicerolo-2-fosforanu w roztworze wpływała hamująco na akumulację uranu. Poziom nagromadzenia tego nuklidu był kilkakrotnie niższy w porównaniu z warunkami bezsubstratowymi (rys. 3). Otrzymane wyniki badań były zatem odmienne przy wyższych stężeniach estru od obserwacji Macaskie i Deana (1987, 1984b, 1987). Zastanawiające jest jednak, że autorzy ci prowadzili akumulację uranu w roztworach o pH 6,9 gdy wiadomo, że jony uranylowe powyżej pH 6 ulegają w znacznym stopniu hydrolizie i wytrąceniu (Nakajima i in. 1979).

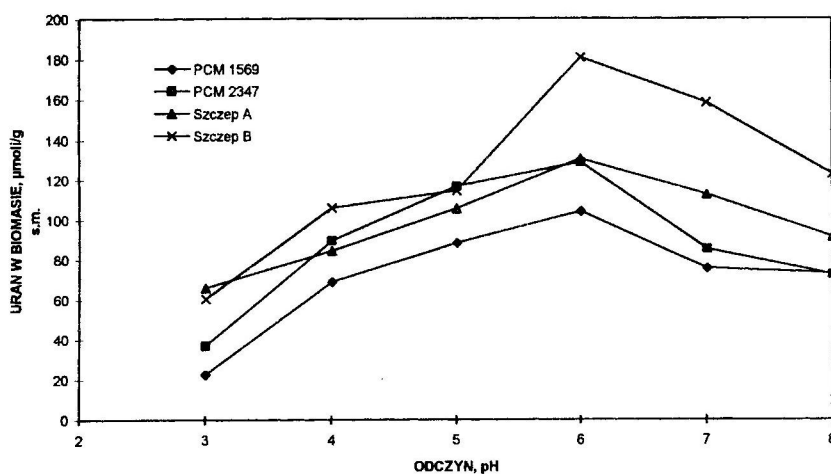
Szukając przyczyn rozbieżności uzyskanych obserwacji z wynikami prac Macaskie i Deana (1987, 1984b, 1987) badano wpływ stężenia glicerolo-2-fosforanu w zakresie 0,5 do 16 mM na akumulację uranu. Próby zawierały 0,4 g/l biomasy bakterii napowietrzanych przez wytrząsanie w obecności 0,1 mM uranylu i zmiennych stężeń glicerolo-2-fosforanu przy pH 6, w temperaturze 30 °C. Oznaczenie ilości uranu akumulowanego w biomacie bakterii następowało po 3-godzinnej inkubacji. Wyniki tych obserwacji przykładowo dla *C. freundii* podano na rys. 4. Stwierdzono, że małe stężenia glicerolo-2-fosforanu (1,0 mM) powodowały około 30-procentowy wzrost akumulacji uranu w porównaniu z kontrolą bezsubstratową. Wyższe stężenia tego estru powodowały natomiast obniżenie akumulacji uranu. Interesujące były przyczyny tego efektu wynikające z 10-krotnego zwiększenia stężenia glicerolo-2-fosforanu. Mogły one ujawnić inne oddziaływania tego estru niż wynikające z jego enzymatycznej hydrolizy.

Badano również wpływ pH na akumulację uranu. Obserwacje te prowadzono w poprzednio opisany sposób w warunkach bezsubstratowych (rys. 5) oraz w obec-

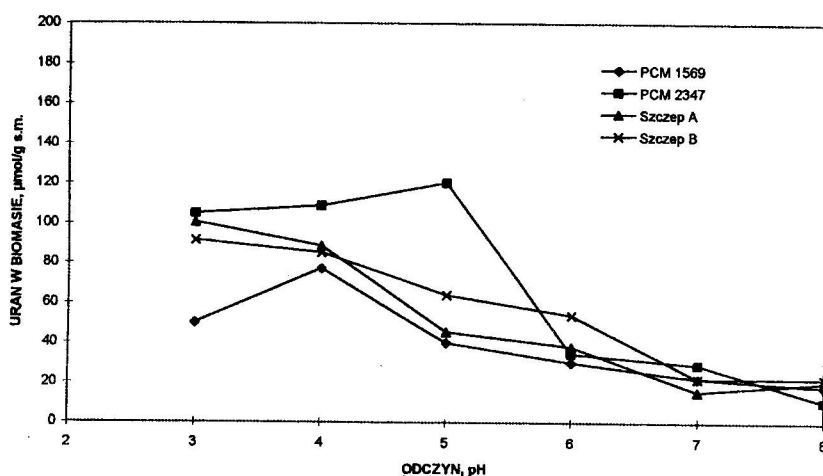


Rys. 4. Akumulacja uranu przez szczep bakterii *Citrobacter freundii* PCM 2347 przy różnych stężeniach glicerolo-2-fosforanu. Biomasa bakterii 0,4 g/l. Inkubacja 3 godziny z uranylem o stężeniu początkowym 0,1 mM, pH 6

ności 10 mM glicerolo-2-fosforanu (rys. 6) w zakresie odczynu od pH 3 do 8. Obserwacje akumulacji prowadzone w układzie bezsubstratowym wykazały, że wartość pH 6 może być uznana za optymalną do maksymalnego nagromadzenia uranu (rys. 5). Nieoczekiwanie natomiast obecność glicerolo-2-fosforanu jako substratu fosfatazy (rys. 6) powodowała 1,5–3-krotne zwiększenie akumulacji przy



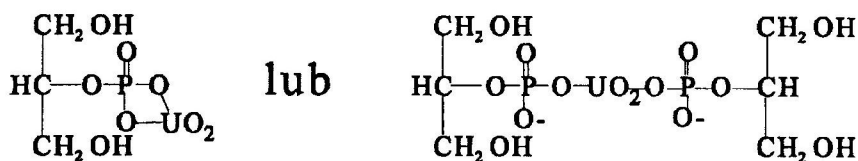
Rys. 5. Wpływ pH na akumulację uranu przez szczepy bakterii o wzmożonej aktywności fosfatazowej w układzie bezsubstratowym. Biomasa bakterii 0,4 g/l. Stężenie początkowe uranylu 0,1 mM



Rys. 6. Wpływ pH na akumulację uranu przez szczepy bakterii o wzmożonej aktywności fosfatazowej w obecności 10 mM glicerolo-2-fosforanu. Biomasa bakterii 0,4 g/l. Stężenie początkowe uranylu 0,1 mM

wartości pH 3 w porównaniu do warunków bezsubstratowych. Wyższy odczyn pH ($\text{pH} > 5$) powodował istotne obniżenie akumulacji uranu w obecności glicerolo-2-fosforanu.

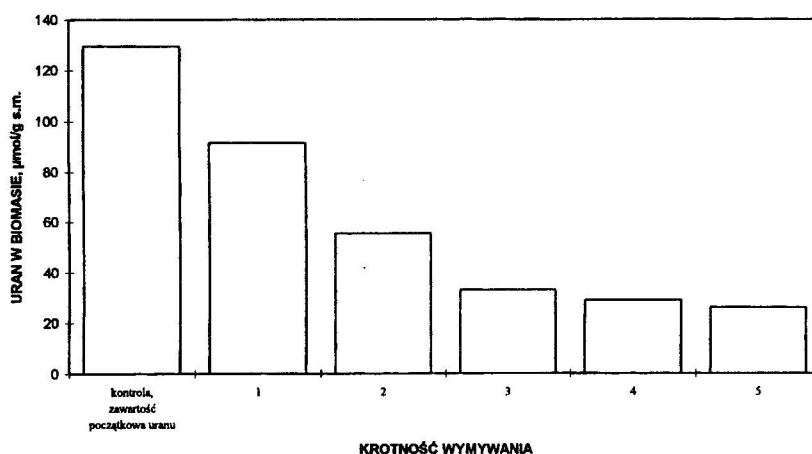
Na podstawie obserwacji wysunięto przypuszczenie, że glicerolo-2-fosforan mógłby tworzyć rozpuszczalne związki z jonami uranilowymi. W takim przypadku glicerolo-2-fosforan mógłby się zachowywać podobnie jak jony węglanowe. Proces akumulacji uranu był silnie hamowany przez glicerolo-2-fosforan podobnie jak przez jony węglanowe, które tworzą trwałe rozpuszczalne połączenie kompleksowe z uranylem $[\text{UO}_2(\text{CO}_3)_3]^{4-}$ (Nakajima i in. 1979). Hipotetyczny wzór związków glicerolo-2-fosforanu z jonami uranilowymi mógłby mieć postać podaną na rys. 7.



Rys. 7. Hipotetyczny wzór związków glicerolo-2-fosforanu z jonami uranylu

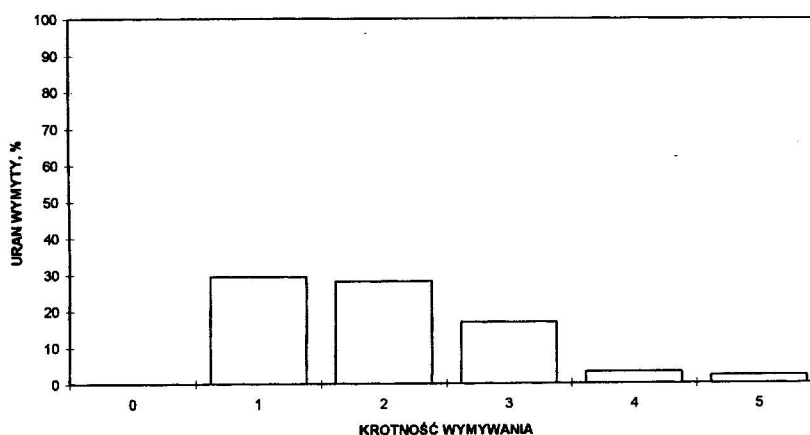
Zgodnie z założeniem o tworzeniu się rozpuszczalnych połączeń, glicerolo-2-fosforanu z jonami uranilowymi, można sądzić, że przy niskim pH związki te były nietrwałe i wolne jony uranilowe mogły podlegać sorpcji w biomacie bakterii (rys. 6).

W literaturze brak jest informacji o związkach glicerolo-2-fosforanu z jonami metali. Pośrednim dowodem tworzenia się tych połączeń byłoby wykazanie zdolności wymywania akumulowanego uranu z biomasy bakterii przez glicerolo-2-fosforan.

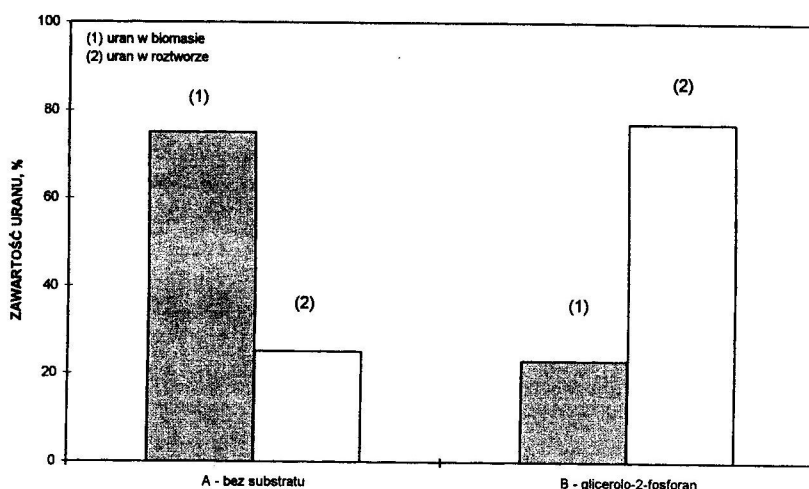


Rys. 8. Zmiany zawartości uranu w biomasie *Citrobacter freundii* PCM 2347 podczas kilkakrotnego wymywania 10 mM glicerolo-2-fosforanem, pH 6

Przeprowadzono próbę wymywania uranu akumulowanego w biomasie bakterii 10 mM glicerolo-2-fosforanem. W tym celu do pięciu probówek z odwirowaną biomasą o tej samej zawartości uranu dodawano po 20 ml glicerolo-2-fosforanu. Po 1-minutowym wytrząsaniu, próbki wirowano i w osadzie biomasy bakterii oznaczano zawartość uranu. Czynność tę powtarzano kilkakrotnie. Na rysunku 8 podano przykładowo zawartość uranu w biomasie *Citrobacter freundii* PCM 2347 podczas wymywania uranu z biomasy tych bakterii w wyniku kolejnych prób. Okazało się, że pod wpływem 5-krotnego wymycia z powierzchni komórek szczepu *Citrobacter freundii* usunięciu ulegało 80% akumulowanego uranu (rys. 8 i 9).



Rys. 9. Procentowe wymycie uranu z biomasy *Citrobacter freundii* PCM 2347 10 mM glicerolo-2-fosforanem, pH 6



Rys. 10. Bilans uranu wprowadzonego do roztworu podczas akumulacji tego nuklidu przez szczep A bakterii glebowych. Biomasa bakterii 0,4 g/l. Stężenie początkowe uranylu 0,1 mM, pH 6. Czas inkubacji 3 godziny. (A) Akumulacja w układzie bez substratu fosfatazy, (B) Akumulacja w obecności 10 mM glicerolo-2-fosforanu, (1) Uran w biomacie, (2) Uran pozostały w roztworze

W celu określenia stosunku ilości uranu zawartego w biomacie oraz w roztworze przeprowadzono przykładowo bilans tego metalu podczas akumulacji z użyciem szczepu A bakterii glebowych o zwiększonej aktywności fosfatazowej (rys. 10). Akumulację prowadzono w warunkach bezsubstratowych oraz w obecności glicerolo-2-fosforanu jako substratu fosfatazy. Stwierdzono, że w warunkach bezsubstratowych po trzech godzinach inkubacji niewielka część uranu znajdowała się w roztworze (25%), natomiast większość (75%) była związana w biomacie. Inaczej kształtował się ten stosunek w obecności glicerolo-2-fosforanu. Większa ilość uranu pozostawała w roztworze (77%), zaś akumulacja w biomacie była mniejsza (23%). Potwierdzałoby to sugestię o tworzeniu się rozpuszczalnych związków uranylu z glicerolo-2-fosforanem lub produktem jego degradacji. Związki te utrudniały akumulację uranu w biomacie bakterii.

Przeprowadzono obserwacje ultracienkich skrawków komórek bakterii akumulujących uran. Badania w transmisyjnym mikroskopie elektronowym wykazały obecność wyraźnych zaczerwień powierzchni komórek pochodzących od uranu. Stwierdzono bardziej intensywną akumulację uranu przez komórki badanych szczepów bakterii o wzmożonej aktywności fosfatazy w roztworach bezsubstratowych, bez dodatku glicerolo-2-fosforanu, niż w obecności 10 mM tego estru. Aickin, Dean i in. (1979) badali lokalizację ołowiu w komórkach *Citrobacter* sp. za pomocą skaningowego i skaningowo-transmisyjnego mikroskopu elektronowego oraz analizy rentgenograficznej. Komórki tych bakterii w obecności glicerolo-2-fosforanu akumulowały zwiększone ilości ołowiu. Badania prowadzone przy użyciu

analizy rentgenograficznej wykazywały wysokie zagęszczenie ołowiu i fosforu w postaci nierozpuszczalnego PbHPO_4 po zewnętrznej stronie komórek. Podobne rezultaty tworzenia nierozpuszczalnych osadów uzyskano w przypadku uranu.

Wyniki badań prezentowanych w niniejszej pracy nie potwierdziły więc obserwacji Macaskie i Deana (1987, 1984b, 1987a) o dodatnim wpływie glicerolo-2-fosforanu na akumulację uranu przez powszechnie występujące bakterie o wzmożonej aktywności fosfatazy. Możliwe, że było to związane ze specyficznymi cechami szczepu *Citrobacter* sp. stosowanego w pracach zespołu Macaskie i Deana.

LITERATURA

- AICKIN R.M., DEAN A.C.R., CHEETHAM A.K., SKARNULIS A.J. (1979), *Electron microscope studies on the uptake of lead by a Citrobacter sp.*, Microbios Letters, **9**, s. 7.
- CHMIEŁOWSKI J., WOŹNICA A., PYTLAK M. (1993), *Akumulacja i ługowanie radionuklidów przez drobnoustroje*, Fizykochemiczne Problemy Mineralurgii, **27**, s. 227.
- CHWISTEK M., CHMIEŁOWSKI J., TOMZA I. (1988), *Radiometric determination of uranium accumulated in bacterial cells*, Talanta **35**, s. 227.
- GLAUERT I.M. (1974), *Practical methods in electron microscopy*, Amsterdam, North-Holland Publ. Comp.
- HAMBLING S.G., MACASKIE L.E., DEAN A.C.R. (1987), *Phosphatase synthesis in a Citrobacter sp. growing in continuous culture*, J. Gen. Microbiol., **133**, s. 2743.
- MACASKIE L.E., DEAN A.C.R. (1984a), *Cadmium accumulation by immobilized cells of a Citrobacter sp.*, Environmental Tech. Letters **5**, s. 177.
- MACASKIE L.E., DEAN A.C.R. (1984b), *Heavy metal accumulation by immobilized cells of a Citrobacter sp.*, Biotechnol. Lett. **6**, s. 71.
- MACASKIE L.E., DEAN A.C.R. (1987a), *Use of immobilized biofilm of Citrobacter sp. for the removal of uranium and lead from aqueous flows*, Enzyme Microb. Tech. **9**, s. 2.
- MACASKIE L.E., DEAN A.C.R., CHEETHAM A.K., JACEMAN R.J.B., SKARNULIS A.J. (1987b), *Cadmium accumulation by a Citrobacter sp.: the chemical nature of the accumulated metal precipitate and its localization in the bacterial cells*, J. Gen. Microbiol., **133**, s. 539.
- MEJBAUM-KATZENELLENBOGEN W., MOCHNACKA J. (1969), *Kurs praktyczny z biochemii*, Warszawa, PWN.
- MICHEL L.J., MACASKIE L.E., DEAN A.C.R. (1986), *Cadmium accumulation by immobilized cells of a Citrobacter sp. using various phosphatase donors*, Biotechnol. Bioeng., **28**, s. 1358.
- NAKAJIMA A., HORIKOSHI T., SAKAGUCHI T. (1979), *Ion effects on the uptake of uranium by Chlorella regularis*, Agric. Biol. Chem., **43**, s. 625.
- PICKETT A.W., DEAN A.C.R. (1977), *Phosphatase activities of cadmium and zinc resistant strains of Bacillus subtilis subsp. niger and of a Pseudomonas sp.*, Microbios Letters, **6**, s. 103.

Chmielowski J., Pytlak M., Woźnica A., (1995), Bioaccumulation of uranium by bacteria with enhanced phosphatase activity, *Physicochemical Problems of Mineral Processing*, 29, 157–168 (Polish text)

Macaskie and Dean reported in their papers a phosphatase-mediated uranium uptake by a *Citrobacter* sp. with enhanced phosphatase activity and capacity of using phosphate esters, such as glycerol-2-phosphate, as phosphate donors. Liberation of phosphate ions (HPO_4)²⁻ leads to the precipitation of heavy metals in the form of insoluble precipitates tightly bound with the cell surface.

The aim of this work was to perform a critical evaluation of this mechanism of metal accumulation in selected strains of bacteria. A *Citrobacter freundii* and some other strains of bacteria isolated from soil polluted by heavy metals were used. All these strains exhibited an enhanced activity of an acid-type phosphatase with a pH optimum at pH 5 typical of microorganisms.

Time course of accumulation of uranium (in the form of 0.1 mM uranyl nitrate) by these bacteria was followed in a substrate-less system and at increasing concentrations (from 1 to 16 mM) of glycerol-2-phosphate as a substrate for the phosphatase. It was found that at low glycerol-2-phosphate concentrations (1.0 mM) the bacteria accumulated about 30% uranium more than in a substrate-less system. At higher glycerol-2-phosphate concentrations less metal was accumulated. Electron microscopic observation of ultra thin sections of cells revealed that metal was located mainly at the surface as a dense precipitate.

It was presumed that an observed inhibition of uranium accumulation could be connected with a formation of soluble uranyl compounds with glycerol-2-phosphate within a pH range of 5 to 6. Such a presumption was confirmed by revealing a 60 to 80 % uranium recovery from the loaded cells in 10 mM glycerol-2-phosphate solution.

Our results did not confirm the suggestions of Macaskie and Dean concerning the application of common bacteria with enhanced phosphatase activity to the accumulation of uranium. Most likely this divergence is due to the special features of their *Citrobacter* sp. strain producing an atypical surface-located acid-type phosphatase active in a wide pH range of 5 to 9.